

# Karakterisasi Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) pada Oosit Sapi yang Dikoleksi dari Folikel Preantral dengan Metode Dotblotting

*by* Widjiati Widjiati

---

**Submission date:** 21-May-2018 01:10PM (UTC+0800)

**Submission ID:** 966555016

**File name:** g-Dikoleksi-dari-Folikel-Preantral-dengan-Metode-Dotblotting.pdf (64.66K)

**Word count:** 1893

**Character count:** 12135

<sup>2</sup>  
Karakterisasi Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) pada Oosit Sapi yang Dikoleksi  
dari Folikel Preantral dengan Metode Dotblotting  
<sup>2</sup>  
Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) Characterization On Bovine Oocyte  
Collected From Preantral Follicle Using Dotblotting Method

Widjiati, Epy M Luqman, Firman Kristianto Sumedi, Ismudiono, Nanik Sianita

1

Fakultas Kedokteran Hewan Un<sup>2</sup>

<sup>2</sup> PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

Telp. 031.5992785, Fax. 031.5993015

Email : widjiati@yahoo.com

<sup>1</sup>  
Abstract

The main purpose of this research was to know the character of Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) protein isolated from bovine oocyte, collected from preantral follicle. Bovine ovary that was collected from slaughterhouse washed with NaCl. To collect oocyte from preantral follicle we use aspiration technique. The GDF-9 protein was isolated from oocyte and used for producing the antibody for dotblotting method. The rabbits which had been injected by GDF-9 antigen (immunization) was bleed every week to get the blood serum and five week after immunization, the rabbits had boosted again and continued to bleed until 10 week. The antibody anti-GDF-9 from the rabbits blood serum was reacted with GDF-9 antigen that had been identified with western blotting method. The dot-blot result showed that the intensity of dot color had increased significantly from bleeding III (five week after injected with antigen GDF-9) and reach the highest titer of antibody at bleeding IX. It's mean that GDF-9 protein from bovine oocyte which collected from preantral follicle can be characterized with dotblotting method and the highest titer antibody showed at bleeding IX.

Keywords : GDF-9, preantral follicle , antral follicle, bovine oocyte, dotblotting.

<sup>3</sup>

Pendahuluan

Dalam rangka meningkatkan produktifitas ternak, banyak teknik yang dikembangkan. Salah satu cara untuk meningkatkan produktifitas ternak tersebut adalah dengan In Vitro Fertilization (IVF). Namun kendala yang dialami saat ini adalah tingkat keberhasilan IVF masih belum mampu memproduksi embrio dengan kualitas optimum. Masalah tersebut perlu dikaji secara molekuler reproduksi, mengingat pada proses maturasi oosit banyak protein diduga berperan dan sampai saat ini sintesis dan fungsi protein tersebut secara molekuler masih belum banyak diketahui (Pawshet al., 1996).

Pertumbuhan dan pematangan folikel dikontrol oleh sistem kompleks hormonal. Pada tahap ini dibutuhkan beberapa hormon untuk menunjang terjadinya perkembangan pada oosit, yaitu dari oosit primer menjadi ootid yang siap untuk proses fertilisasi (ootidogenesis) melalui proses meiosis. Hormon yang memiliki<sup>7</sup> peran penting dalam kontrol tersebut antara lain Follicle Stimulating Hormone (FSH), Luteinizing Hormone (LH), Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), dan hormon Estrogen.

Luteinizing Hormone (LH) mempunyai fungsi untuk mengovulasikan folikel yang telah matang pada ovarium (Hafez dan Hafez, 2000), sedangkan Follicle Stimulating Hormone (FSH) memiliki peran utama dalam proses pertumbuhan awal folikel primer hingga menjadi folikel vesikular (Hernawan, 2003). Keberadaan FSH mampu mempercepat pertumbuhan 6-12 folikel primer setiap bulan (Guyton, 1994). Menurut Molinda (2004) Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) yang berasal dari hipotalamus berguna untuk menstimulus kelenjar pituitari untuk mensekresikan FSH dan LH. Proses tersebut juga mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi sel-sel granulosa pada folikel sehingga meningkatkan kemampuan folikel untuk menghasilkan hormon esterogen sebagai penghambat sekresi FSH.

Selain membutuhkan hormon pada tahapan folikulogenesis dan oogenesis ternyata juga memerlukan growth factor yang mempunyai peranan untuk menstimulasi sel untuk berproliferasi dan berdiferensiasi, yang diharapkan oosit akan mempunyai kualitas yang tinggi. Growth factor tersebut antara lain adalah Insulinlike Growth Factor (IGF), IGF - BP (IGF - Binding Protein), Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) dan Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9). Namun sampai saat ini sintesis dan fungsi protein tersebut secara molekuler masih belum banyak diketahui (Widjati dan Rimayanti, 2002).

Growth Factor merupakan faktor lokal yang berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus, peran sesungguhnya dari faktor lokal ini belum banyak dikaji lebih dalam. Oleh karena itu, penting untuk mengetahui peran sitokin ini dalam proses folikulogenesis dan maturasi oosit (Widjati, 2002). Frandson (1992) juga menyebutkan bahwa growth factor mempunyai pengaruh penting dalam meningkatkan sekresi protein pada cairan folikel, hal ini disebabkan karena growth factor berperan dalam meningkatkan transpor asam amino melintasi membran sel serta meningkatkan pengikatan asam amino sehingga membentuk protein.

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) adalah suatu protein yang termasuk super famili dari TGF- $\beta$ , yang disekresikan oleh oosit dan hewan yang kekurangan GDF-9 akan memperlihatkan berhentinya perkembangan pada folikel. GDF-9 juga dapat mempengaruhi perkembangan sel-sel ovarium, termasuk untuk melakukan sintesis DNA pada membran sel granulosa dan proses penurunan cAMP sehingga proses meiosis dapat berlangsung.

Penggunaan protein GDF-9 pada proses in vitro, menunjukkan hasil bahwa GDF-9 sangat berpengaruh bagi perkembangan folikel preantral dan menstimulasi ovarian inhibin A pada tikus. Selain itu, beberapa studi telah memperlihatkan bahwa pemberian GDF-9 dapat memperluas cumulus oophorus dan mengurangi mRNA

reseptor LH pada sel granulosa tikus yang telah di kultur (Vitt et al., 2002).

Sebagai upaya untuk meningkatkan produktifitas ternak, maka perlu dilakukan penelitian tentang karakter dari fraksi protein GDF-9. Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengkarakterisasi protein GDF-9 pada oosit sapi dan uji spesifisitasnya dilakukan menggunakan metode dotblotting. Jadi protein GDF-9 diharapkan dapat digunakan untuk membantu memproduksi embrio dengan kualitas optimum.

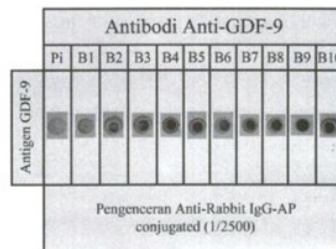
## Materi dan Metode Penelitian

Ovarium sapi yang berasal dari RPH dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis, kemudian dilakukan aspirasi pada folikel preantral dengan jarum berukuran 18 G yang dihubungkan dengan spuit 5 cc yang telah berisi phospat buffer saline (PBS) dan dilakukan koleksi oosit. Hasil koleksi oosit dilakukan isolasi antigen dengan metode elektroelusi, kemudian diimunsasikan pada 4 ekor kelinci yang bertujuan untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi terhadap GDF-9. Antibodi anti-GDF-9 yang didapat kemudian dilakukan dotblotting dengan cara direaksikan dengan antigen GDF-9. Hasil yang diperoleh dilihat dari berubahnya warna dot pada membran nitroselulosa yang menunjukkan adanya ikatan antara antibodi anti-GDF-9 dengan antigen GDF-9.

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah ditemukan adanya fraksi protein GDF-9 pada oosit sapi yang telah dikoleksi dari folikel preantral. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan warna dot dari hasil reaktivitas antara antigen dengan antibodi.

## Hasil dan Pembahasan

Hasil dari koleksi sampel darah yang dilakukan pada ke-4 ekor kelinci dengan pengambilan masing-masing 10 kali bleeding yang kemudian dikumpulkan menjadi satu atau pool serum didapatkan 10 sera. Karakterisasi protein GDF-9 ini diuji dengan memakai 10 sera tersebut menggunakan metode Dotblotting. Hasil dari metode dotblotting yang dilakukan pada GDF-9 tersebut dapat dilihat pada gambar 4.5 dibawah ini.



**Gambar I. Uji** Spesifitas anti-GDF-9 terhadap GDF-9 pada serum pre-imun dan serum kelinci yang diinduksi GDF-9 dengan dotblotting.

Pada metode dot blot antibodi primer yang digunakan berasal dari serum darah ke-4 ekor kelinci jantan yang telah disuntik dengan isolat antigen GDF-9 dengan ditambahkan adjuvant. Imunisasi pertama dengan menyuntikkan isolat GDF-9 dengan ditambahkan CFA sebagai adjuvant dilakukan dua hari setelah pengambilan darah preimun. Lima hari kemudian dilakukan booster pertama dengan menggunakan isolat GDF-9 dengan ditambahkan IFA. Satu minggu setelah booster pertama dilakukan pengambilan darah pertama dan dilanjutkan setiap minggunya dalam rentang waktu lima minggu. Dua hari setelah pengambilan darah kelima dilakukan booster kedua dengan menyuntikkan isolat GDF-9 dan ditambahkan IFA sebagai adjuvant, kemudian pengambilan darah dilakukan lima hari setelah booster kedua dan dilakukan berulang setiap minggunya selama lima minggu berturut-turut.

Pembacaan hasil noda pada membran nitroselulosa diatas akan lebih mudah dianalisa apabila dibaca dalam bentuk skor penilaian yang berdasarkan gradasi kegelapan warna dot seperti pembacaan pada tabel 4.1 berikut dibawah ini.

Warna dot pada membran NC hasil dotblotting mulai terlihat meningkat nyata saat antigen GDF-9 direaksikan dengan antibodi

antiGDF-9 dari bleeding ke-3 (minggu ke-5 setelah dilakukan imunisasi). Warna dot pada membran NC hasil dotblotting juga menunjukkan bahwa ketika antibodi dari hasil bleeding ke-4 (minggu ke-6 setelah imunisasi) direaksikan dengan antigen GDF-9 terlihat lebih gelap daripada warna dot menggunakan antibodi dari bleeding ke-3, hal ini kemungkinan disebabkan karena kandungan antibodi dari serum darah bleeding ke-4 lebih tinggi daripada kandungan antibodi hasil bleeding ke-3. Warna dot pada hasil dotblotting kemudian terlihat menurun (menjadi lebih terang) kembali pada saat antibodi hasil bleeding ke-5 direaksikan dengan antigen GDF-9, ini karena kemungkinan kandungan antibodi dari hasil bleeding ke-5 mulai menurun kembali sehingga ikatan antara antibodi dengan antigen menjadi lebih sedikit.

Pada hasil dotblotting (gambar 4.1) setelah dilakukan booster kedua, warna dot terlihat mulai meningkat (menjadi gelap) kembali pada saat antibodi hasil bleeding ke-7 (minggu ke-9 setelah imunisasi pertama) direaksikan dengan antigen GDF-9. Hasil dotblotting juga menunjukkan bahwa warna dot pada saat antibodi anti-GDF-9 dari hasil bleeding ke-9 direaksikan dengan antigen GDF-9 terlihat paling gelap dan paling bulat dibandingkan dengan warna dot

Tabel 1. Pembacaan Hasil Dotblotting pada Membran Nitroselulosa

Skor Pengambilan darah ke-										
Pi	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
0	1	2	4	5	2	2	4	5	6	3



lainnya. Warna dot hasil dotblotting terlihat menurun kembali pada saat antibodi dari bleeding ke-10 direaksikan dengan antigen GDF-9. Hal ini kemungkinan dikarenakan kandungan antibodi anti-GDF-9 dalam serum darah hasil bleeding ke-10 telah menurun kembali setelah mencapai puncaknya pada bleeding ke-9.

Imunogenisitas dan antigenisitas memiliki hubungan yang terkait, akan tetapi keduanya memiliki definisi yang berbeda. Imunogenisitas dinyatakan sebagai kemampuan antigen untuk menginduksi respon imun humoral ataupun cell mediated, sedangkan antigenisitas dinyatakan sebagai kemampuan substansi asing untuk berkombinasi secara spesifik dengan antibodi ataupun reseptor pada permukaan sel (Goldsby et al., 2000). Pada hasil dotblotting menunjukkan warna dot yang terlihat paling gelap dan paling bulat adalah pada saat antibodi anti-GDF-9 hasil bleeding ke-9 (minggu ke-11 setelah dilakukan imunisasi) ditetaskan dengan antigen GDF-9, ini mungkin disebabkan karena pada bleeding ke-9 kandungan antibodi adalah yang paling tinggi, sehingga pada saat antibodi anti-GDF-9 ditetaskan pada membran NC dapat berikatan sempurna dengan antigen GDF-9. Menurut Abbas dan Litchman (2005), antigen merupakan molekul yang dapat berkombinasi dengan antibodi spesifik. Walaupun demikian, tidak semua antigen bersifat imunogenik.

Sifat imunogenik suatu antigen akan berpengaruh terhadap kemampuan antigen untuk menginduksi respon imun dalam tubuh. Respon imun primer mengakibatkan aktivasi pada sel-sel B sedangkan respon imun sekunder menstimulasi peningkatan kl. sel B memori. Hal inilah yang menyebabkan respon imun sekunder memiliki kandungan antibodi yang diproduksi lebih tinggi dibandingkan respon imun primer. Pada respon imun primer sel-sel B akan terdiferensiasi menjadi sel plasma dan akan menghasilkan IgM dan IgG, dengan jumlah IgM yang lebih banyak. Berbeda halnya dengan respon imun sekunder yang mengalami peningkatan produksi IgG dan IgA serta E pada beberapa situasi (Abbas dan Litchman, 2005).

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein GDF-9 dari oosit sapi yang dikoleksi dari folikel preantral dapat dikarakterisasi dengan menggunakan metode dotblotting dan kandungan antibodi tertinggi terlihat pada pengambilan bleeding ke-9.

## Daftar Pustaka

- Abbas, A. K. dan A. H. Litchman. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Saunders. Philadelphia. Pp 22, 44, 58, 191.
- Frandsen, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi IV. terjemahan B. Srigondo dan K. Prasno. Gajah Mada University Press, Yogyakarta : 683.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt dan A. Osborne. 2000. Immunology. W. H. Freeman and Company. California. Pp 63-65.
- Guyton, A. C. 1994. Function of Human Body. W. B. Saunders company. Philadelphia.
- Hafez, B. dan E. S. E. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animals. Lippincot Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Hernawan, E. 2003. Peningkatan Kinerja Reproduksi pada Fase Kebuntingan melalui Teknik Superovulasi pada Ternak Domba. Term paper. Introductory Science Philosophy (PPS702). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Molinda, P. E. 2004. Endocrine Physiology. Lange Medical Books, McGraw-Hill Company. New York.
- Pawshhe, C. H., A. Palanisamy, M. Taniju, S. K. Jain dan S. M. Totey. 1996. Comparison of Various Maturation Treatments on 'In Vitro Maturation. J. Theriog. 46: 971982.
- Vitt, U. A., S. Mazerbourg, C. Klein dan A. J. Hsueh. 2002. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9 (GDF-9). 2002
- Widjiati. 2002. Induksi maturasi oosit secara In Vitro oleh TGF-β asal oosit kumulus kompleks. [Disertasil. Universitas Brawijaya, Malang.
- Widjiati dan Rimayanti. 2002. Seleksi diameter folikel terhadap morfologi embrio kambing tahap satu sel dan angka fertilisasi in vitro. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.

# Karakterisasi Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) pada Oosit Sapi yang Dikoleksi dari Folikel Preantral dengan Metode Dotblotting

## ORIGINALITY REPORT

49%

SIMILARITY INDEX

49%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

17%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1

[repository.unair.ac.id](https://repository.unair.ac.id)

Internet Source

18%

2

[journal.unair.ac.id](https://journal.unair.ac.id)

Internet Source

13%

3

[epyfkh.blog.unair.ac.id](https://epyfkh.blog.unair.ac.id)

Internet Source

10%

4

Submitted to iGroup

Student Paper

3%

5

[www.ajas.info](http://www.ajas.info)

Internet Source

1%

6

[repository.ipb.ac.id](https://repository.ipb.ac.id)

Internet Source

1%

7

[www.parentsviaeggdonation.org](http://www.parentsviaeggdonation.org)

Internet Source

1%

8

[www.ejournal-s1.undip.ac.id](http://www.ejournal-s1.undip.ac.id)

Internet Source

1%



---

Exclude quotes      Off  
Exclude bibliography      On

Exclude matches      Off